民族药马利筋内生真菌生物活性研究[1]

殷娜[2]，宋娜丽[3]，普晓佳[2]，顾茜兰[2]，杨海浩[2]，万春平[1]，祁燕[1]，李小丝[1]，郑喜[1*]
（1.云南中医药大学第一附属医院 中心实验室，昆明 650021；2.云南中医药大学 中药学院，昆明 650500；3.云南省中医中药研究院 中心实验室，昆明 650223）

摘要：药用植物内生真菌能够产生与宿主相同或相似的活性物质，民族药马利筋生物活性广泛。为获得马利筋活性内生真菌资源，该研究基于“民族药-内生真菌-活性成分”的研究思路，考察了 168 株马利筋内生真菌代谢产物的生物活性，分别采用 SRB 法、Griess 法、PNPG 法和 DPPH 法对内生真菌发酵液乙酸乙酯提取物进行抗肿瘤、抗炎、α-葡萄糖苷酶抑制和抗氧化等生物活性测定，并对活性菌株进行 ITS 菌种鉴定。结果显示：所筛选的 168 株内生真菌有 22 株表现出不同程度的生物活性；其中 9 株内生真菌具有显著抗肿瘤活性，其 IC_{50} 值在 0.1 ~ 40 μg • mL^{-1} 之间；菌株 MJF-53 在 2.5 μg • mL^{-1} 时对 LPS 诱导的 Raw264.7 释放的 NO 和 IL-1β 均具有明显的抑制作用；7 株内生真菌表现出不同程度的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，其 IC_{50} 值在 1.0 ~ 4.0 mg • mL^{-1}，其中 MYF-16 和 MYF-55 对 α-葡萄糖苷酶抑制活性接近阿卡波糖；19 株内生真菌具有不同程度的 DPPH 自由基清除活性，其中菌株 MYF-9、MYF-19 和 MJF-84 表现出中等强度的抗氧化活性，IC_{50} 值分别为 13.562、17.776、12.395 μg • mL^{-1}；ITS 菌株鉴定发现 22 株活性菌株分属于链格孢属（*Alternaria*）、刺盘孢属（*Colletotrichum*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、间座壳属（*Diaporthe*）、踝节菌属（*Talaromyces*）和新壳梭孢菌（*Neofusicoccum parvum*）等不同种属。该研究表明马利筋内生真菌的生物活性具有多样性，为从马利筋内生真菌中挖掘潜在新型天然抗肿瘤、抗炎、降糖和抗氧化活性化合物奠定基础。

关键词：马利筋，内生真菌，抗肿瘤，抗炎，α-葡萄糖苷酶抑制剂，DPPH 自由基，ITS
中图分类号：Q93-3　　　文献标识码：A

Biological activities of endophytic fungi from *Asclepias curassavica*

YIN Na[2], SONG Nali[3], PU Xiaojia[2], GU Qianlan[2], YANG Haihao[2], WAN Chunping[1], QI Yan[1], LI Xiaosi[1], ZHENG Xi[1*]
(1.*Central Laboratory*, *The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, Kunming 650021, China; 2.*School of Traditional Chinese Medicine*, *Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, Kunming 650500, China; 3.*Central Laboratory, Yunnan Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, Kunming 650223 China)

---

[1]收稿日期：2020-08-05
基金项目：国家自然科学基金项目（81960745）；云南省基础研究计划面上项目（2019FB123）；云南省科技厅-云南中医药大学中医联合专项（2018FF001(-077)； 2018FF001(-009)）[supported by The National Natural Science Foundation of China(81960745); The Applied Basic Research Program of Yunnan Province (2019FB123); Yunnan Provincial Science and Technology Department-Applied Basic Research Joint Special Fund of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (2018FF001(-077); 2018FF001(-009))]。
作者简介：殷娜（1994-），硕士研究生，研究方向为天然药物作用及机制，（E-mail）2711732008@qq.com。
*通讯作者：郑喜，硕士，助理研究员，研究方向为中药和微生物天然产物药理，（E-mail）Zhengxi138@163.com。

Abstract: Endophytic fungi in medicinal plants have the capacity to produce bioactive compounds whose features have great identity or similarity with the phytohosts. Since *Asclepias curassavica* has been known to possess a broad range of biological activities, we sought to obtain the active endophytic fungi from this plant. We performed the study followed the idea of "ethnic drug-endophytic fungi-active ingredients", and thereafter we examined the bio-activities of fungal metabolites from 168 strains of endophytic fungi isolated from *A. curassavica*. To evaluate the activities of anti-tumor, anti-inflammatory, anti-α-glucosidase and antioxidant in these fungi, the ethyl acetate extracts from fermentation broth of endophytic fungi were first determined using the methods of SRB, Griess, PNPG and DPPH, respectively. Furthermore, we identified the bioactive fungal strains with conserved ITS sequencing. Our results reveal 22 in 168 isolated strains have variable biological activities; and of which 9 strains have obvious antitumor effect with the IC_{50} values of 0.1 - 40 μg·mL^{-1}. Further, the strain MJF-53 display prominent inhibitory effect on the release of both NO and IL-1β in Raw264.7 cell line by LPS- induction under the concentration of 2.5 μg·mL^{-1}. There were 7 strains showing α-glucosidase inhibitory activity with the IC_{50} values ranging from 1.0 to 4.0 mg·mL^{-1}, Especially, the inhibitory activity of MYF-16 and MYF-55 are close to acarbose; 19 endophytic fungi have different degrees of DPPH radical scavenging activities, among which MYF-9, MYF-19 and MJF-84 show moderate antioxidant activity with IC_{50} values of 13.562, 17.776 and 12.395 μg·mL^{-1} respectively; The ITS identification show that the 22 active strains are mainly distribute in six genera: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Diaporthe*, *Talaromyces* and *Neofusicoccum*. This study shows that the bioactivities of the endophytic fungi from *A. curassavica* are diverse, which lays a foundation for exploring new potential natural anti-tumor, anti-inflammatory, hypoglycemic and antioxidant compounds from the endophytic fungi of *A. curassavica*.

Keywords: *Asclepias curassavica*, endophytic fungus, antitumor, anti-inflammatory, α-glucosidase inhibitor, DPPH free radical, ITS

微生物是大量天然产物的重要来源，从微生物中获得的天然化合物在营养、农业和医疗保健等方面做出了重要贡献（Singh et al., 2017）。植物内生真菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部，而不使宿主植物病变和排斥的真菌（Hardoim et al., 2015）。大量研究表明，药用植物内生真菌在抗肿瘤、抗微生物、抗炎、抗氧化、降糖、杀虫等方面有较好的生物活性。Wei et al.(2020)从莞根中分离得到内生真菌pr10 能够显著抑制 A549 的生长；Ran et al.(2017)从喜树组织中分离获得能产抗肿瘤化合物喜树碱的内生真菌；Sailesh et al.(2020)从黄芩根中分离的内生真菌 QF001，其代谢产物能够有效抑制 LPS 刺激 Raw264.7 中促炎细胞因子 NO、TNF-α 和 IL-6 的表达；Geethanjali et al.(2019)从长春花中分离的黑毛壳菌代谢物乙酸乙酯提取物具有较强的 DPPH 自由基清除活性，Afra et al.(2015)研究也发现葫芦种子和苦杏内生真菌代谢物具有较强的抗氧化能力；郑喜等（2015；2014）从昆明山海棠中分离获得一株具有抑制 α-糖苷酶作用的链革孢属真菌 ThF-63 和一株具有抗菌和杀虫活性的简青霉 ThF-11。因此，药用植物内生真菌被认为是活性天然产物的重要来源（Sanjana et al., 2012），近年来，从药用植物内生真菌中寻找新型天然活性化合物已成为新的研究热点，药用植物内生真菌代谢产物的多样性为寻找新颖天然活性化合物提供了有效途径。

马利筋（*Asclepias curassavica*）是云南傣医常用药，性凉，味甘，具有调经活血、止痛退热、消炎散肿的功效（蒋振忠和冯德强，2006），被广泛用于强心、癌症、哮喘、发烧、

炎症、腹泻、淋病、风湿、心血管等疾病的治疗（蒋洪和宋纬文，2017；杨卫平等，2016；李冈荣，2017）。目前，马利筋的研究主要集中在药效学方面，研究表明马利筋提取物具有抗菌、抗癌、心血管、镇痛、解热等多种药理活性（Ali, 2015; Raja & Ravindranadh, 2014）；药效机制方面，Zheng et al.(2019)研究发现马利筋乙酸乙酯提取物能显著抑制 A549、Hela、SK-OV-3、MGC-803、NIC-H1975 等多株肿瘤细胞的增殖，通过激活 P38 和 JNK MAPK 信号通路诱导 NIC-H1975 发生凋亡。然而，有关马利筋内生真菌及其生物活性的研究鲜有报道。

研究证实，药用植物中蕴藏着丰富多样的内生真菌，与宿主植物长期进化中使之能产生与宿主相同或相似的活性物质（王景仪等，2020）。Stierle et al.(1993)从红豆杉中分离获得产紫杉醇的内生真菌。因此，从药用植物内生真菌中寻找天然活性产物是一条有效的途径。基于此，我们提出“马利筋内生真菌可能具有抗肿瘤、抗炎症和抗氧化等生物活性”的科学假说，基于“药用植物-内生菌-生物活性”的研究思路，首次以马利筋内生真菌为研究对象，对 168 株西双版纳产马利筋内生真菌进行抗肿瘤、抗炎、α-葡萄糖苷酶抑制及 DPPH 自由基清除等活性研究，为后续从中深入发掘潜在新型天然抗肿瘤、抗炎、降糖和抗氧化等活性化合物奠定良好基础，并对保护民族药马利筋野生资源具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 内生真菌和供试细胞株

168 株供试内生真菌分离自云南西双版纳产新鲜马利筋的茎和叶中，其中茎中分离获得 106 株（MJF-1~MJF-106），叶中分离获得 62 株（MYF-1~MYF-62），菌株培养于 PDA 和 PDB 培养基。供试细胞株为人非小细胞肺癌 NIC-H1975、人乳腺癌细胞 MCF-7、人结肠癌细胞 HCT-116、人宫颈癌细胞 Hela、人肝癌细胞株 HepG2 和小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7，其中 NIC-H1975 和 MCF-7 采用 RPMI1640 完全培养基培养，其他细胞株采用 DMEM 高糖完全培养基培养，以上细胞购于中国科学院昆明动物研究所细胞库。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1000 mL，PH 自然；马铃薯葡萄糖液体培养基（PDB）：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，蒸馏水 1000 mL，PH 自然；RPMI1640 完全培养基：RPMI1640 基础培养基 900 mL，胎牛血清 100 mL，双抗 10 mL，混合均匀；DMEM 高糖完全培养基：DMEM 高糖培养基 900 mL，胎牛血清 100 mL，双抗 10 mL，混合均匀，4 ℃冰箱保存备用。

1.3 主要仪器和设备

DHZ-052D 型恒温摇床（上海博彩生物科技有限公司）、DHP-9052 型恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）、Heidolph 型旋转蒸发仪（德祥科技有限公司）、SpectraMax i3x 型多功能酶标仪（美谷分子仪器(上海)有限公司）、二氧化碳培养箱（Thermofisher Scientific）。

1.4 内生真菌的培养及提取物的制备

挑取分离所得的马利筋内生真菌到新鲜 PDA 培养基上进行活化，活化后的内生真菌接种于 PDB 培养基中，28 ℃、150 r • min^{-1} 摇床培养 8 d，过滤菌丝，收集发酵液并用乙酸乙酯萃取 3 次，萃取物于旋转蒸发仪上浓缩得提取物浸膏，将提取物浸膏用 DMSO 溶解配成初始浓度 200 mg • mL^{-1} 的母液，4 ℃冰箱保存备用。

1.5 肿瘤细胞毒活性测定

采用 SRB 法（Skehan et al., 1990）进行肿瘤细胞毒活性测定，取对数生长期的肿瘤细胞株 NIC-H1975、MCF-7、HCT-116、Hela 和 HepG2 按 $4×10^4$ 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μL，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 24 h，加入 100 μL 不同浓度（40、20、10、5、

2.5、1.25 μg·mL^{-1}）提取物，每个浓度设 3 个复孔，同时设 3 个对照孔，置于 CO_2 培养箱中继续培养 48 h，弃培养上清加入 4 ℃预冷的 10%的 TCA 100 μL·孔$^{-1}$，4 ℃固定 1 h 后用蒸馏水洗涤 5 次，空气中自然风干。加入 4 mg·mL^{-1} 的 SRB 溶液 100 μL·孔$^{-1}$，室温染色 15 min，弃上清液，用 1%醋酸洗涤 5 次，空气干燥，加入 100 μL·孔$^{-1}$ 的 Tris（10 mmol·L^{-1}）溶液，室温放置 5 min，于 560 nm 波长测 OD 值。按以下公式计算各菌株提取物对肿瘤细胞的生长抑制率，半数抑制浓度 IC_{50} 值采用 Origin 软件计算。

$$I(\%) = (Ay - Ac) / Ac \times 100\%$$。

式中：I 代表抑制率；Ay 代表给药组 OD 值；Ac 代表对照组 OD 值。

1.6 抗炎活性测定

1.6.1 细胞活力测定

采用 SRB 法（Skehan et al., 1990）检测各提取物对 Raw264.7 细胞活力的影响，取对数生长期细胞按 3×10^5 个·孔$^{-1}$ 接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μL，设置内生真菌提取物组和对照组，提取物组加入 50 μL 不同浓度（10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0156 25 μg·mL^{-1}）提取物和 50 μL DMEM 高糖完全培养基，对照组加入 100 μL 培养基，每组设 3 个复孔，加药后，放于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，SRB 法检测 Raw264.7 细胞活力。

1.6.2 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞中 NO 的测定

采用 Griess 法（Kim et al., 2020）进行 NO 检测，取对数生长期的 Raw264.7 细胞按 3×10^6 个·孔$^{-1}$ 接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。将细胞分为空白组（DMEM 培养基）、模型组（1.5 μg·mL^{-1} LPS＋DMEM 培养基）和内生真菌提取物组（1.5 μg·mL^{-1} LPS＋各浓度提取物（2.5、1.25、0.625、0.3125、0156 25 μg·mL^{-1}）），每组设 3 个复孔。加药后，放于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，收集培养上清，采用 Griess 法检测培养上清中 NO 水平。

1.6.3 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的测定

按 1.6.2 的方法对 Raw264.7 细胞进行处理，按照酶联免疫吸附试剂盒说明书检测细胞培养上清中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-1β（IL-1β）水平，根据标准曲线，计算上清中各种炎症因子的含量。

1.7 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

参照郑喜等（2015）方法，将内生真菌提取物和阿卡波糖用 PH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度，**α-**葡萄糖苷酶冻干粉配成浓度为 0.8 U·mL^{-1} 溶液，底物（PNPG）配成浓度 2.5 mmol·L^{-1} 溶液。设置对照组（磷酸盐缓冲液＋酶液＋底物）、空白对照组（磷酸盐缓冲液）、样本测定组（磷酸盐缓冲液＋提取物＋酶液＋底物）、样本对照组（磷酸盐缓冲液＋提取物）和阳性对照组（磷酸盐缓冲液＋阿卡波糖＋酶液＋底物），依次加入 20 μL 提取物或阿卡波糖（5、2.5、1.25、0.625 mg·mL^{-1}）、20 μL 磷酸钾缓冲液、20 μL α-葡萄糖苷酶，37 ℃恒温孵育 15 min 后，加入 20 μL 2.5 mmol·L^{-1} 的 PNPG，37 ℃恒温反应 15 min，再加入 80 μL 0.1 mol·L^{-1} 的 $NaCO_3$ 溶液终止反应，于 405 nm 波长测吸光度值 A。每个样本设三个复孔，实验重复 3 次。按以下公式计算抑制率并用 Origin 软件计算 IC_{50} 值。

$$I(\%) = [1 - (Ast - Asc) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

式中：I 代表抑制率；Ast 代表样本测定组 OD 值；Asc 代表样本对照组 OD 值；Ac 代表对照组 OD 值；Ab 代表空白对照组 OD 值。

1.8 DPPH 自由基清除活性测定

参照 Guo et al.(2020)方法进行测定，将内生真菌提取物和维生素 C 用无水乙醇稀释至所需浓度，DPPH 用无水乙醇配成 0.2 mmol·L^{-1} 的溶液。分别将 100 μL 各浓度测试提取物溶液（800、400、200、100 和 50 μg·mL^{-1} ）和 100 μL DPPH 溶液加入到 96 孔板中，轻轻混

匀，室温下避光静置反应 30 min 后于 517 nm 波长测定其吸光度 As，同时测定 100 μL DPPH 溶液与 100 μL 无水乙醇混合后的吸光度 Ab，以及 200 μL 无水乙醇的吸光度值 Aref。按以下公式计算提取物对 DPPH 自由基的清除率，并用 Origin 软件计算 IC_{50} 值。

$$I(\%)=[(As-Aref)-(Ab-Aref)]/(Ab-Aref)\times100\%$$。

式中：*I* 代表 DPPH 自由基清除率；*As* 代表测试样本和 DPPH 混合溶液 OD 值；*Ab* 代表 DPPH 和无水乙醇混合溶液 OD 值；*Aref* 代表无水乙醇 OD 值。

1.9 活性菌株的鉴定

参照谭小明等（2014）方法进行活性菌株鉴定，将纯化好的活性菌株菌丝（0.5-1 g）在液氮中迅速研磨成粉，参照天根真菌 DNA 提取试剂盒操作说明提取真菌 DNA。采用通用引物 ITS4（TCCTCCGCTTATTGATATGC）和 ITS5（GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG）按以下反应条件进行 PCR 扩增：95 ℃，4 min；95 ℃，30 s，56 ℃，30 s，72 ℃，1 min，30 个循环；72 ℃，10 min。PCR 扩增产物取 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳检测，并委托擎科生物技术有限公司测序，反馈序列通过 NCBI(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)进行比对，确定活性菌株种属。

2 结果与分析

2.1 马利筋内生真菌代谢产物对肿瘤细胞生存率的影响

通过 SRB 法测定 168 株马利筋内生真菌抗肿瘤活性，结果见表 1。从表 1 可以看出，9 株内生真菌提取物表现出广谱而显著细胞毒作用，其中以 MYF-16 活性最强，活性强于顺铂。大部分活性菌株对 NIC-H1975、HCT-116 和 Hela 较 MCF-7 和 HepG2 敏感，具有更好地抑制作用；菌株 MJF-33 对 HepG2 肿瘤细胞较为敏感，其 IC_{50} 为 0.147 μg • mL^{-1}，而对其他 4 株肿瘤细胞的 IC_{50}>10 μg • mL^{-1}；从菌株分布来看，活性菌株主要集中于马利筋的茎，有 8 株，而叶中仅获得 1 株活性菌株 MYF-16，然而来源于茎中的内生真菌活性弱于叶中内生真菌，可能跟宿主马利筋抗肿瘤活性成分主要集中于叶有关。

表 1　9 株马利筋内生真菌抗肿瘤活性

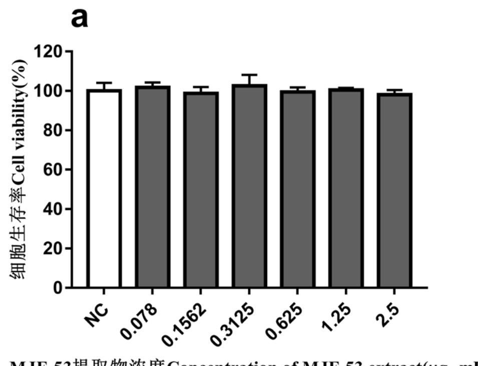
Table 1 Anti-tumor activity of 9 endophytic fungi from *A. curassavica*

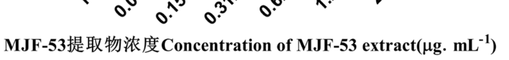
菌株编号 Strain numbers	肿瘤细胞株 Tumor cell lines（IC_{50}，μg • mL^{-1}）				
	NIC-H1975	HCT-116	MCF-7	Hela	HepG2
MYF-16	0.091	0.135	1.222	0.577	0.144
MJF-7	4.576	9.088	31.571	9.026	12.349
MJF-16	19.055	12.095	36.029	12.442	18.903
MJF-33	10.983	14.016	26.001	14.425	0.147
MJF-53	2.604	2.689	9.224	3.817	6.711
MJF-61	5.264	6.955	9.633	6.949	11.784
MJF-64	9.056	9.643	20.909	14.581	21.156
MJF-68	13.031	18.976	38.596	20.055	39.752
MJF-99	6.745	8.322	9.077	9.157	18.717
顺铂 Cisplatin	5.344	2.715	5.764	0.358	0.297

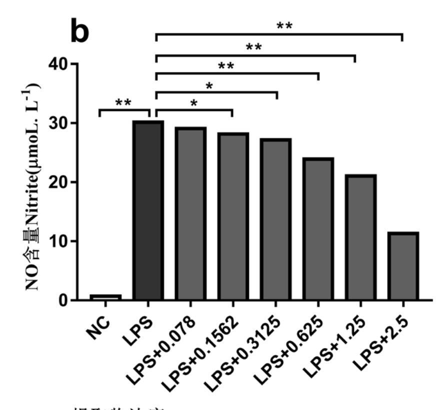
2.2 MJF-53 对 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的影响

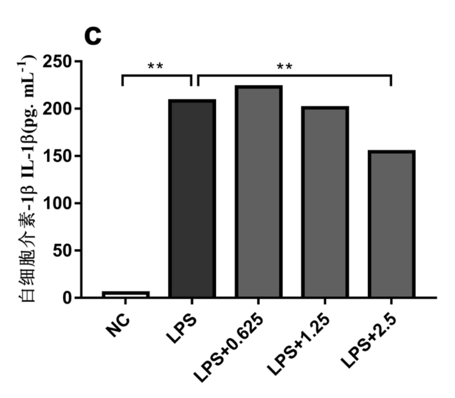
通过建立炎症细胞模型，测定各内生真菌代谢物对 Raw264.7 细胞中 NO 的影响，结果发现菌株 MJF-53 在浓度小于 2.5 μg • mL^{-1} 时对细胞无毒性，且能浓度依赖性抑制 NO 的分泌（图 1：a，b）。进一步测定 MJF-53 对 LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 IL-6、IL-1β 和 TNF-α

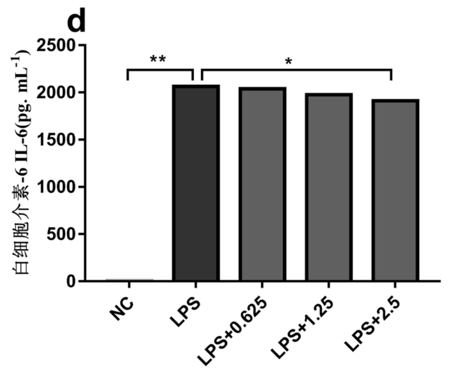
的影响，结果发现该菌株提取物在浓度 2.5 μg • mL^{-1} 时能选择性抑制 IL-1β 的产生，然而对 TNF-α 和 IL-6 的分泌无影响（图 1：c，d），推测 MJF-53 可能通过选择性抑制促炎因子 IL-1β 分泌上游相关信号通路从而抑制炎症发生。











NC. 空白对照组；LPS. LPS 诱导组；*表示与 LPS 诱导组比较，*P*<0.05；表示与 LPS 诱导组比较，*P*<0.01。**

NC. Blank control group; LPS. LPS-induced group; **P*<0.05 vs LPS-induced group; ***P*<0.01 vs LPS-induced group.

图 1 MJF-53 对 Raw264.7 细胞活度（a）、NO（b）、IL-1β（c）和 IL-6（d）的影响

Fig.1 Effects of MJF-53 on viability(a), NO(b), IL-1β(c) and IL-6(d) of Raw264.7

2.3 马利筋内生真菌代谢产物对 α-葡萄糖苷酶活性的影响

通过 α-葡萄糖苷酶抑制活性筛选获得 7 株对 α-葡萄糖苷酶具有较好抑制活性的内生真菌，抑制作用呈浓度依赖性，在浓度 5 mg • mL^{-1} 时对 α-葡萄糖苷酶表现出显著抑制作用，抑制率>70%，各活性菌株 IC_{50} 值均小于 4 mg • mL^{-1}。其中 MYF-16 和 MYF-55 对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性最强，其 IC_{50} 值分别为 1.996、1.823 mg • mL^{-1}，抑制活性接近阿卡波糖，结果见表 2 和表 3。

表 2 马利筋内生真菌提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制率

Table 2 Inhibitory rate of endophytes against α-glucosidase

菌株编号	抑制率 Inhibitory rate（%）			
Strain numbers	0.625 mg •mL^{-1}	1.25 mg •mL^{-1}	2.5 mg • mL^{-1}	5 mg • mL^{-1}
MYF-9	-15.46±1.72	-27.61±0.86	-48.97±1.08	-71.26±0.76
MYF-16	-16.84±2.96	-37.91±2.84	-57.91±0.31	-75.77±0.58
MYF-19	-7.45±0.13	-22.63±1.00	-50.83±1.60	-70.56±1.19
MYF-55	-14.14±0.56	-39.71±0.98	-64.75±0.24	-80.56±0.66

MJF-47	-12.37±0.12	-24.95±0.82	-51.44±0.91	-75.90±0.48
MJF-53	-17.49±2.91	-29.72±0.29	-50.79±0.06	-72.74±0.37
MJF-64	-4.02±0.10	-8.24±0.72	-20.14±0.06	-87.07±0.76
阿卡波糖 Acarbose	-31.75±1.38	-57.31±1.03	-74.25±0.89	-90.53±1.26

注：n=3。下同。

Note: n=3. The same below.

表 3 马利筋内生真菌提取物抑制 α-葡萄糖苷酶活性（n=3）

Table 3 Anti-α-glucosidase activity of endophytes of *A. curassavica* (n=3)

菌株编号 Strain numbers	IC_{50}(mg·mL^{-1})	菌株编号 Strain numbers	IC_{50}(mg·mL^{-1})
MYF-9	2.524±0.064	MJF-47	2.403±0.016
MYF-16	1.996±0.127	MJF-53	2.352±0.067
MYF-19	2.719±0.059	MJF-64	3.028±0.023
MYF-55	1.823±0.017	阿卡波糖 Acarbose	1.071±0.346

2.4 马利筋内生真菌代谢产物对 DPPH 自由基清除活性的影响

通过 DPPH 法对 168 株内生真菌提取物进行抗氧化活性测定，结果发现在浓度 800 μg·mL^{-1} 时，有 19 株内生真菌提取物对 DPPH 自由基的清除率均在 50%以上，其中 11 株清除率在 80%以上，菌株 MYF-9、MYF-19 和 MJF-84 表现出较强的抗氧化活性，IC_{50} 分别为 13.562、17.776 和 12.395 μg·mL^{-1}。从菌株分布来看，DPPH 自由基清除活性菌株有 13 株分布于马利筋的茎中，6 株分布于叶中。结果见表 4 和表 5。

表 4 马利筋内生真菌提取物对 DPPH 自由基的清除率（n=3）

Table 4 DPPH radical scavenging rate of extracts of endophytic fungi(n=3)

菌株编号	清除率 Scavenging activity（%）				
Strain numbers	50 μg·mL^{-1}	100 μg·mL^{-1}	200 μg·mL^{-1}	400 μg·mL^{-1}	800 μg·mL^{-1}
MYF-9	-85.65±1.73	-87.69±7.84	-89.53±2.93	-90.17±3.22	-90.30±2.47
MYF-15	-15.45±1.75	-29.69±5.41	-51.51±5.34	-77.12±2.80	-86.33±1.38
MYF-16	-40.03±5.29	-85.66±1.05	-88.61±1.71	-89.33±1.47	-90.42±5.19
MYF-19	-50.94±7.65	-89.02±1.14	-90.19±2.44	-90.66±4.45	-90.22±5.58
MYF-25	-15.41±6.38	-22.89±6.16	-34.86±7.09	-46.88±4.53	-52.68±1.33
MYF-55	-36.91±6.55	-87.67±6.14	-88.26±3.71	-89.73±5.24	-90.35±2.25
MJF-7	-8.85±2.07	-19.55±3.22	-36.00±2.78	-58.42±7.17	-81.58±2.48
MJF-11	-9.95±0.63	-19.88±1.84	-34.01±1.23	-52.56±7.28	-75.04±2.34
MJF-13	-3.34±0.18	-9.05±0.17	-19.98±1.13	-32.56±4.71	-55.05±1.64
MJF-33	-22.70±2.61	-34.16±2.37	-55.47±1.79	-76.35±1.49	-85.90±3.20
MJF-53	-52.63±6.41	-82.30±7.64	-86.52±4.25	-88.51±1.63	-89.23±7.25
MJF-56	-6.88±1.15	-14.46±1.28	-25.58±6.21	-39.27±3.22	-55.69±3.26
MJF-64	-22.17±1.83	-37.80±1.94	-58.16±1.62	-81.00±6.35	-82.87±5.14
MJF-72	-19.42±3.54	-30.29±3.58	-47.47±3.10	-65.74±1.69	-69.89±2.07
MJF-76	-9.19±0.80	-15.34±0.04	-25.67±1.00	-43.24±1.24	-57.79±3.22
MJF-84	-24.63±1.71	-44.19±2.03	-70.09±1.31	-79.17±1.91	-83.46±4.53
MJF-89	-22.96±1.44	-33.30±2.34	-53.52±1.26	-52.47±6.02	-57.41±2.91
MJF-90	-16.13±0.56	-25.04±1.70	-40.31±1.26	-49.76±2.44	-60.30±4.15
MJF-98	-22.77±2.13	-53.83±3.68	-87.54±4.61	-87.42±5.10	-85.82±3.19
维生素 C	-77.00±0.62	-82.38±0.52	-85.93±2.67	-88.83±0.71	-90.47±0.02

Vitamin C

表 5 马利筋内生真菌对 DPPH 自由基清除活性（n=3）

Table 5 DPPH free radical scavenging activity of endophytic fungi (n=3)

菌株编号 Strain numbers	IC_{50}(mg・mL^{-1})	菌株编号 Strain numbers	IC_{50}(mg・mL^{-1})
MYF-9	13.562±0.633	MJF-53	25.058±0.745
MYF-15	183.872±5.573	MJF-53	627.102±24.136
MYF-16	35.218±2.140	MJF-64	152.235±5.597
MYF-19	17.776±0.840	MJF-72	244.419±21.094
MYF-25	505.058±21.172	MJF-76	570.594±25.080
MYF-55	36.306±0.485	MJF-84	12.395±1.137
MJF-7	289.213±13.689	MJF-89	329.201±17.770
MJF-11	337.489±4.232	MJF-90	412.952±6.312
MJF-13	669.071±29.514	MJF-98	79.068±5.381
MJF-33	160.851±9.433	维生素 C Vitamin C	1.793±0.133

2.5 活性菌株 ITS 鉴定结果

NCBI 比对发现活性菌株序列相似度均接近 100%，主要分布于链格孢属（*Alternaria*）、刺盘孢属（*Colletotrichum*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、间座壳属（*Diaporthe*）、踝节菌属（*Talaromyces*）和新壳梭孢菌（*Neofusicoccum parvum*）六个种属，结果见表 6。由表 6 可以看出活性菌株主要集中分布于链格孢属和间座壳属两个属，其中 9 株属于链格孢属，5 株属于间座壳属，其他四个属仅有 8 株，链格孢属和间座壳属可能是马利筋优势活性菌株种属。

表 6 马利筋活性菌株种属鉴定结果

Table 6 Identification of active strain from *A. curassavica*

菌株编号 Strain numbers	拉丁名 Latin name	序列相似度 Sequence similarity（%）	菌株编号 Strain numbers	拉丁名 Latin name	序列相似度 Sequence similarity（%）
MYF-9	*Alternaria tenuissima*	100	MJF-47	*Colletotrichum cliviicola*	100
MYF-15	*Alternaria alternata*	100	MJF-53	*Alternaria alternata*	100
MYF-16	*Alternaria arboresens*	100	MJF-56	*Diaporthe melonis*	99.06
MYF-19	*Alternaria alternata*	100	MJF-61	*Diaporthe subellipicola*	100
MYF-25	*Colletotrichum siamense*	100	MJF-64	*Diaporthe melonis*	100
MYF-55	*Alternaria arborescens*	100	MJF-68	*Diaporthe phaseolorum*	100
MJF-7	*Fusarium equiseti*	100	MJF-72	*Neofusicoccum parvum*	100
MJF-11	*Fusarium proliferatum*	99.8	MJF-84	*Diaporthe melonis*	100
MJF-13	*Alternaria arborescens*	100	MJF-89	*Talaromyces cellulolyticus*	100
MJF-16	*Alternaria arborescens*	100	MJF-90	*Neofusicoccum parvum*	99.8
MJF-33	*Alternaria tenuissima*	100	MJF-98	*Neofusicoccum parvum*	100

3 讨论与结论

药用植物内生真菌能产生结构新颖、种类多样和生物活性广泛的次生代谢产物，是活性天然产物的重要来源（Sunil et al., 2018; Geethanjali et al., 2019）。在与宿主长期共寄生过程

中宿主可能将其遗传物质或信息传递给其内生真菌，使之具有和宿主相同或类似的代谢途径，导致内生真菌能够产生与宿主相同或相似生物活性的物质。马利筋作为傣药被广泛用于癌症、哮喘、强心、炎症、风湿、发烧、腹泻、淋病、心血管等疾病的治疗（蒋洪和宋纬文，2017；杨卫平等，2016；李冈荣，2017），提示其具有多种生物活性，尤以抗肿瘤和抗炎活性引起广泛关注。前期研究我们发现马利筋具有显著而广谱的抗肿瘤活性，通过激活 p38 和 JNK MAPK 信号通路诱导 NIC-H197 细胞凋亡介导抗肿瘤（zheng et al., 2019），本研究发现 MYF-16 具有显著而广谱的生物活性，其抗肿瘤活性尤为显著，对非小细胞肺癌 NIC-H197 最强，推测 MYF-16 可能产生宿主马利筋相同或相似生物活性的物质，研究结果与前期报道的红豆杉内生真菌能够产紫杉醇（Stierle et al., 1993; Somjaipeng et al., 2015）以及喜树内生真菌产喜树碱（Ran et al., 2017）结果相似。因此，活性菌株 MYF-16 可作为目标菌株进一步深入探讨其活性代谢产物及抗肿瘤作用机制。

NLRP3 炎症小体的激活在调节炎症反应中具有重要作用（Patel et al., 2017; Mao et al., 2017）。ATP 等信号分子促进胞内钾离子外流介导 NLRP3、ASC 和 caspase-1 组装成蛋白嵌合体，进而激活 caspase-1 自身剪切产生 p20 和 p10 两个亚基，介导促炎因子 IL-1β 和 IL-18 剪切成熟释放，导致炎症反应的发生（丁杨和胡容，2018）。本研究发现菌株 MJF-53 在 2.5 μg·mL-1 时无明显毒性且能有效抑制 LPS 诱导的 Raw264.7 中促炎因子 NO 和 IL-1β 的分泌，推测该菌株可能产生抑制 IL-1β 分泌的抗炎活性成分，通过抑制 NLRP3 炎症小体激活抑制 IL-1β 剪切成熟释放介导抗炎作用，具体的抗炎机制及体内抗炎作用需要进一步深入确证。

药用植物中蕴藏着丰富多样的内生真菌，内生真菌是天然活性化合物的重要来源。ITS 鉴定发现 22 株活性菌株分属于 *Alternaria*、*Colletotrichum*、*Fusarium*、*Diaporthe*、*Talaromyces* 和 *Neofusicoccum* 六个属，其中 9 株属于链格孢属（*Alternaria*），5 株属于间座壳属（*Diaporthe*），广谱活性菌株 MYF-16、MJF-53 和 MJF-64 也分属于这两个属，由此推测链格孢属和间座壳属可能是马利筋优势内生真菌，结果与谭小明等（2015）报道的链格孢属（*Alternaria*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、刺盘孢属（*Colletotrichum*）等真菌是药用植物的优势菌群相符。此外，内生真菌资源多样性与宿主植物所处的环境密切有关，刘芸等（2010）研究表明虎杖组织中内生真菌的种类和数量与季节密切相关；贾敏等（2014）研究发现不同地域银杏内生真菌的种类差别很大。因此，为了获得更加丰富的马利筋活性内生真菌资源，可以选择不同季节、多个采样点进行采样后对不同部位进行分离、鉴定。

综上所述，本研究筛选获得多株具有抗肿瘤、抗炎、抑制 α-葡萄糖苷酶和清除 DPPH 自由基等活性的菌株，为从马利筋内生真菌中深入发掘抗肿瘤、抗炎、降糖和抗氧化活性物质奠定基础，对于开发傣药马利筋植物资源和拓展傣药马利筋应用具有一定的指导的意义。

参考文献

AFRA K, IETIDAL M, JUSTINNE T, et al., 2015. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some sudanese medicinal plants[J]. Asian Pac J Trop Med, 8(9): 701-704.

ALI EA, 2015. Chemical constituents and pharmacological effects of *Asclepias curassavica*-a review[J]. Asian J Pharm Clin Res, 5(2): 83-87.

DING Y, HU R, 2018. Research progress in mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and regulation[J]. Prog Pharm Sci, 42(4):294-302.[丁杨，胡容，2018. NLRP3 炎症小体激活及调节机制的研究进展[J]. 药学进展，42(4):294-302.]

GEETHANJALI D, KAMALRAJ S, JAYABASKARAN C, 2019. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*[J]. BMC Microbiol, 19(1): 22.

GUO L, MA J, MA Y, et al., 2020. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharides from inonotus cuticularis and their antioxidant activities[J]. Chem Biodivers. 17:

e2000326.

HARDOIM PR, OVERBEEK LS, BERG G, et al., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 79(3): 293-320.

JIA M, JIANG YP, ZHANG W, et al., 2014. Comparison on diversity of endophytic fungi from Ginkgo biloba in tianmu mountain and jiande area[J]. Drugs Clin, 29(3):262-268.[贾敏，蒋益萍，张伟，等，2014. 浙江天目山和建德地区产银杏中内生真菌多样性的比较研究[J]. 现代药物与临床，29（3）：262-268.]

JIANG H, SONG WW, 2017. Practical picture of chinese herbal medicine[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press: 1: 393. [蒋洪, 宋纬文, 2017. 中草药实用图典[M]. 福州:福建科学技术出版社:1:393.]

JIANG ZZ, FENG DQ, 2006. Research on traditional medicine of dai nationality in simao[M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press: 12: 155-199. [蒋振忠, 冯德强, 2006. 思茅傣族传统医药研究[M]. 成都:四川科学技术出版社:12:155-199.]

KIM NH, KIM HK, LEE JH, et al., 2020. Juglone suppresses LPS-induced inflammatory responses and NLRP3 activation in macrophages[J]. Molecules, 25(13): 3104.

LI GR, 2017. Color atlas of 800 kinds of chinese herbal medicine[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press: 502. [李冈荣, 2017. 800 种中草药彩色图鉴[M]. 福州:福建科学技术出版社:502.]

LIU Y, YIN H, QIU NX, et al., 2010. Isolation and identification of an endophytic fungus producing resveratrol in *Palygonum cuspidatum*[J]. Mycosystema, 4:502-507.[刘芸，殷红，仇农学，2010. 一株产白藜芦醇虎杖内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报，29(4)：502-507.]

MAO Z, LIU C, JI S, et al., 2017. The NLRP3 inflammasome is involved in the pathogenesis of parkinson's disease in rats[J]. Neurochem Res, 42: 1104-1115.

PATEL MN, CARROLL RG, GALVAN PS, et al., 2017. Inflammasome priming in sterile inflammatory disease[J]. Trends Mol Med, 23(2): 165-180.

RAJA S, RAVINDRANADH K, 2014. *Asclepias curassavica*: a review of ethnomedical, phytochemical and pharmacological information[J]. Indo Amer J Pharm Res, 4(4): 2151-2169.

RAN XQ, ZHANG G, LI S, et al., 2017. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminate*[J]. Afr Health Sci, 17(2): 566-574.

SAILESH M, SANG BL, GEUM JK, et al., 2020. Isolation of unstable isomers of lucilactaene and evaluation of anti-inflammatory activity of secondary metabolites produced by the endophytic fungus *fusarium* sp. QF001 from the roots of *Scutellaria baicalensis*[J]. Molecules, 25(4): 923.

SANJANA K, SURUCHI G, MAROOF A, et al., 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites[J]. Phytochemistry Rev, 11:487-505.

SINGH R, KUMAR M, MITTAL A, et al., 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture[J]. 3 Biotech, 7(1): 15.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, et al., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. J Natl Cancer Inst, 82(13): 1107-1112.

SOMJAIPENG S, MEDINA A, KWASNA H, et al., 2015. Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of paraconiothyriurn variabile from english yew trees(taxxs baccata)[J]. Fungal Biol, 119(11): 1022-1031.

STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, 1993. Taxol and taxane production by taxomyces andreanae, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 260(5105): 214-216.

SUNIL KD, MANISH KG, VED P, et al., 2018. Endophytic fungi: a source of potential antifungal compounds[J]. J Fungi (Basel), 4(3): 77.

TAN XM, YU LY, ZHOU YQ, 2014. Isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Dysosma versipellis(Hance)* M.Cheng[J]. Chin Pharm J, 49(5):363-366.[谭小明，余丽莹，周雅琴，2014. 濒危药用植物八角莲内生真菌分离鉴定及抗菌活性研究[J]. 中国药学杂志，49(5):363-366.]

TAN XM, ZHOU YQ, CHEN J, et al., 2015. Advances in research on diversity of endophytic fungi from medicinal plants[J]. Chin Pharm J, 50(18):1563-1580.[谭小明，周雅琴，陈娟，等，2015. 药用植物内生真菌多样性研究进展[J]. 中国药学杂志，50(18):1563-1580.]

WANG JY, LI MQ, LI YR, et al., 2014. Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi in medicinal plants[J]. Biotic Resour, 42(2): 164-172.[王景仪，李梦秋，李艳茹，等，2020. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展[J]. 生物资源，42(2):164-172.]

WEI J, CHEN F, LIU YM, et al., 2020. Comparative metabolomics revealed the potential antitumor characteristics of four endophytic fungi of *Brassica rapa L*[J]. ACS Omega, 5(11): 5939-5950.

YANG WP, XIA TH, LI CD et al., 2016. Characteristic chinese herbal medicine and formula[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 8: 224. [杨卫平, 夏同珩, 李朝斗, 等, 2016. 特色中草药及配方[M]. 贵阳:贵州科技出版社:8:224.]

ZHENG X, LI GH, WANG X, et al., 2014. Antibacterial and nematicidal activity of endophyte ThF-11 *tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch[J]. Chin Pharmacol Bull, 30(12): 1709-1713.[郑喜, 李国红, 王芯, 等, 2014. 昆明山海棠内生真菌 ThF-11 化学成分抗菌杀线虫作用的研究[J]. 中国药理学通报, 30(12):1709-1713.]

ZHENG X, LI GH, WANG X, et al., 2015. Screening and strains identification of α-glucosidase inhibitory activity from endophytes of *tripterygium hypoglaucum*[J]. Chin J ETMF, 21(23): 149-153. [郑喜, 李国红, 王芯, 等, 2015. 昆明山海棠内生真菌 α-糖苷酶抑制活性的筛选及菌株鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 21(23):149-153.]

ZHENG X, XU Y, LIU B, et al., 2019. Ethyl acetate extract of *Asclepias curassavica* induced apoptosis in human cancer cells via activating p38 and JNK MAPK signaling pathways[J]. Evid Based Compl Alternat Med, 2019:9076269.